

Identifikasi *Koi Herpesvirus* (KHV) dengan metode histopatologi pada ikan mas



© BSN 2011

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Mangala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip.....	3
4 Peralatan	3
5 Bahan	4
6 Prosedur	4
7 Interpretasi hasil	6
8 Jaminan mutu	6
Lampiran A (normatif) Komposisi bahan kimia dan cara pembuatan larutan yang dibutuhkan dalam pemeriksaan KHV dengan metoda histopatologi.....	7
Lampiran B (normatif) Diagram alur dan bahan kimia yang diperlukan dalam proses jaringan pada automatic tissue processor	9
Lampiran C (normatif) Prosedur pewarnaan hematoxyline - eosin	10
Lampiran D (informatif) Contoh gambaran hispatologi ikan mas.....	11
Bibliografi.....	16

Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian laboratorium uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang identifikasi *Koi Herpesvirus* (KHV) secara histopatologi pada ikan mas.

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis 65-05-S2 Perikanan Budidaya dan telah dibahas dalam rapat-rapat teknis serta terakhir disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 24 Juni 2010 di Bandung, dihadiri oleh anggota Subpanitia Teknis 65-05-S2 Perikanan Budidaya, wakil-wakil dari pemerintah, produsen, konsumen, lembaga penelitian/pakar dan instansi terkait lainnya serta telah memperhatikan :

- 1 Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.PER.01/MEN/2007 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.
- 2 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
- 3 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
- 4 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 24 Januari 2011 sampai dengan 25 Maret 2011 dengan hasil akhir RASNI.

Identifikasi *Koi Herpesvirus* (KHV) secara histopatologi pada ikan mas

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan identifikasi *Koi Herpesvirus* (KHV) secara histopatologi pada ikan mas.

2 Istilah dan definisi

2.1

badan inklusi intranukleus (*intranuclear inclusion body*)

inti sel yang membesar karena adanya reaksi spesifik dari inti sel yang diakibatkan adanya penetrasi virus

2.2

basofilik

bagian sel yang mampu menyerap zat pewarna *haematoxylene* sehingga sel berwarna ungu atau biru

2.3

clearing

cara penjernihan dan pengeluaran sisa alkohol dari dalam sel/jaringan

2.4

deoxyribo nucleic acid (DNA)

asam deoksiribo nukleat, materi genetik yang berada di dalam inti sel organisme hidup

2.5

dissecting set

seperangkat alat bedah berfungsi untuk membedah contoh dan mencari organ target untuk pengamatan

2.6

drying bench

alat untuk mengeringkan dan melekatkan potongan jaringan pada *slide* yang diangkat dari *floating bath*

2.7

embedding

cara pencetakan organ dengan parafin (dengan titik didih 52 °C - 58 °C) untuk memudahkan pengaturan dalam pemotongan jaringan

2.8

eosinofilik/asidofilik

bagian sel yang mampu menyerap zat pewarna *eosin* sehingga sel berwarna merah

2.9

fiksasi

cara pengawetan organ agar struktur sel dan jaringan tidak rusak paska kematian

2.10

fiksatif

larutan yang digunakan untuk mempertahankan jaringan tanpa menyebabkan perubahan strukturnya

2.11

floating bath

penangas air dengan suhu tertentu (40 °C - 45 °C) untuk meregangkan hasil pemotongan jaringan dari mikrotom

2.12

hipertropi

peningkatan ukuran dari suatu jaringan yang disebabkan oleh meningkatnya ukuran sel

2.13

histo-embeder

alat untuk pencetakan sampel dalam blok parafin setelah *infiltrasi* parafin

2.14

histopatologi

ilmu yang mempelajari perubahan abnormal sel jaringan tubuh

2.15

ikan mas

salah satu jenis ikan air tawar yang termasuk dalam famili *Cyprinidae* sudah terdomestikasi dan banyak dibudidayakan oleh masyarakat

2.16

infiltrasi parafin

cara penyusupan parafin ke dalam sel/jaringan yang dilangsungkan pada titik didih parafin (52 °C - 58 °C) untuk memudahkan pemotongan jaringan

2.17

jaringan

kumpulan sel yang mempunyai struktur dan fungsi yang sama dan menjadi objek pemeriksaan dalam pemeriksaan histopatologi

2.18

karioreksis

perubahan nukleus ditandai dengan adanya fragmentasi nukleus menjadi beberapa bagian kecil

2.19

Koi Herpesvirus (KHV)

merupakan salah satu jenis penyakit virus yang menginfeksi ikan mas dan koi (*Cyprinus carpio*)

2.20

kromatin

bagian inti sel yang lebih mudah terwarnai, membentuk suatu jaringan *fibril nuclear*

2.21

mikrotom

alat yang digunakan untuk memotong jaringan sesuai ketebalan yang diinginkan

2.22

minyak imersi

minyak yang digunakan untuk memperbesar A.N (*Aperture Numerik*) sebagai faktor yang menentukan besarnya "*Airy Disc*" (besarnya layar) dan mempunyai hubungan langsung dengan kemampuan maksimum mikroskop dalam membedakan 2 buah titik terdekat secara terpisah

2.23**mounting**

menutup preparat dengan *cover glass* yang telah ditetesi perekat (*mounting agent*)

2.24**organ target**

organ yang menjadi sasaran infeksi patogen (virus) dan digunakan sebagai objek pemeriksaan

2.25**pemeriksaan**

cara untuk menemukan perubahan abnormal sehingga dapat ditentukan penyebab suatu penyakit

2.26**piknotik**

adanya perubahan pada nukleus ditandai oleh adanya kondensasi kromatin menjadi suatu massa yang terwarnai lebih gelap, homogen dan lebih kecil dari nukleus normal

2.27**preparasi jaringan**

teknik pemotongan organ target untuk memudahkan pengamatan jaringan

2.28**sel**

bagian terkecil penyusun jaringan yang mampu bermetabolisme dan menjadi objek dalam pemeriksaan penyakit dengan metoda histopatologik

2.29**staining set (staining jar)**

tempat pewarnaan irisan jaringan

2.30**tissue processor**

alat dalam proses histopatologi bekerja secara *automatic* atau *manual* dipergunakan untuk memproses jaringan contoh untuk dehidrasi, *clearing* dan *infiltrasi* parafin

2.31**trimming**

teknik pemotongan blok parafin untuk memudahkan pemotongan contoh pada mikrotom, sehingga lebih efisien dan baik

3 Prinsip

Contoh yang diperiksa terlebih dahulu difiksasi, preparasi organ, proses jaringan meliputi dehidrasi, *clearing*, *infiltrasi* parafin, *blocking*, pemotongan dengan mikrotom, pewarnaan, *mounting* kemudian contoh diperiksa dengan mikroskop.

4 Peralatan

- a) alat bedah (*dissecting set*);
- b) alat pemotong jaringan (mikrotom);
- c) alat untuk memproses jaringan (*tissue processor*);
- d) *drying bench*;
- e) *floating bath*;

- f) gelas penutup;
- g) gelas preparat;
- h) *histo-embedder*;
- i) masker;
- j) mikroskop;
- k) *paraffin mold*;
- l) sarung tangan;
- m) *staining set*.

5 Bahan

- a) akuades;
- b) asam asetat *glasial*;
- c) *cassette embedding*;
- d) *chloroform*;
- e) etanol absolut (p.a);
- f) *entellan*;
- g) *eosin yellowish*;
- h) etanol absolut (p.a);
- i) *formaldehyde 37 %*;
- j) *hematoxyline*;
- k) parafin *crumble* dengan titik didih 58 °C - 60 °C;
- l) *xylol*.

CATATAN Pembuatan larutan diuraikan pada Lampiran A.

6 Prosedur

6.1 Fiksasi

Fiksasi dilakukan dengan cara perendaman contoh pada larutan *Bouin* atau formalin *buffer* dengan perbandingan volume 1 bagian spesimen dan 10 bagian larutan *Bouin* atau formalin *buffer*. Fiksasi ini bertujuan agar struktur jaringan contoh dapat dipertahankan seperti saat ikan masih hidup.

6.2 Preparasi organ atau jaringan target

Organ atau jaringan untuk pemeriksaan KHV adalah insang, ginjal, jantung, dan otak. Setiap organ target diambil 0.3 cm² - 0.5 cm² dimasukkan ke dalam *cassette embedding*.

6.3 Dehidrasi, *clearing* dan *infiltrasi* organ atau jaringan (Proses ini dapat menggunakan *automatic* atau *manual tissue processor* seperti pada Lampiran B)

6.3.1 Dehidrasi

Merupakan cara pengeluaran air dari jaringan dengan menggunakan etanol bertingkat dimulai dari 70 % sampai absolut. Apabila jaringan masih keruh pada proses *clearing*, maka proses dehidrasi harus diulang.

6.3.2 *Clearing*

Proses diatas kemudian dipindahkan ke *xylol* I (kesatu) atau *chloroform* I (kesatu) selama 1,5 jam, lalu dipindahkan ke *xylol* II (kedua) atau *chloroform* II (kedua) selama 1,5 jam, kemudian dipindahkan ke *xylol* III (ketiga) atau *chloroform* III (ketiga) selama 1,5 jam

CATATAN *Clearing* bertujuan untuk menghilangkan bahan kimia dehidrasi sehingga contoh menjadi transparan dan bahan ini mempunyai sifat mampu menggantikan bahan kimia dehidrasi dan melarutkan parafin.

6.3.3 Infiltrasi

Contoh dipindahkan ke parafin cair I (kesatu) selama 1,5 jam, kemudian dipindahkan ke parafin cair II (kedua) selama 1,5 jam pada suhu 60 °C.

CATATAN *Infiltrasi* merupakan cara penyusupan parafin ke dalam jaringan contoh yang bertujuan untuk menggantikan *xylo*l sehingga contoh tidak rusak pada waktu dilakukan pemotongan dengan mikrotom.

6.4 Blocking

Contoh organ atau jaringan diambil dan ditempatkan pada *paraffin mold* dengan posisi sesuai tujuan pemeriksaan kemudian ditambahkan parafin cair dan ditutup dengan *cassette embedding*. Selanjutnya dibekukan dan siap untuk dipotong. Sebelum dipotong dilakukan proses *trimming*.

6.5 Pemotongan organ atau jaringan

Pemotongan dilakukan menggunakan mikrotom dengan ketebalan irisan 4 µm – 5 µm. Hasil pemotongan diregangkan pada permukaan air pada *floating bath* yang bersuhu 42 °C - 45 °C. Selanjutnya dilakukan penempelan irisan pada gelas objek yang telah dibersihkan dengan etanol 70 %.

6.6 Perwarnaan jaringan dan sediaan preparat

6.3.1 Deparafinasi

Contoh sediaan (*slide*) yang akan diperiksa direndam dalam *xylo*l I (kesatu) atau *chloroform* I (kesatu) selama 15 menit, kemudian dipindahkan dan direndam dalam larutan *xylo*l II (kedua) atau *chloroform* II (kedua) selama 15 menit dan *xylo*l III (ketiga) atau *chloroform* III (ketiga) 10 menit.

6.6.1 Rehidrasi

Air diberikan pada contoh jaringan dari etanol konsentrasi tinggi ke etanol konsentrasi rendah, dengan cara:

- Contoh direndam dalam etanol absolut I (kesatu) selama 10 menit lalu contoh dipindahkan dan direndam dalam etanol absolut II (kedua) selama 2 menit.
- Selanjutnya, dipindahkan dan direndam dalam etanol 95 % selama 5 menit, etanol 90 % selama 5 menit, etanol 70 % selama 3 menit dan dibilas dalam air mengalir selama 2 menit kemudian bilas kembali dengan akuades selama 3 menit.

6.6.2 Pewarnaan

Dalam pewarnaan ini dipergunakan teknik pewarnaan *hematoxylene* dan *eosin*. Contoh dipindahkan dan direndam dalam *hematoxylene* selama 1,5 menit kemudian dibilas dengan air mengalir selama 8 menit, lalu dipindahkan dan direndam dalam akuades selama 3 menit. Selanjutnya, direndam dalam *eosin* selama 30 menit sampai dengan 60 menit.

CATATAN Prosedur pewarnaan *hematoxylen*-eosin digambarkan pada Lampiran C.

6.6.3 Dehidrasi dan *clearing*

- a. Sediaan direndam dalam etanol 70 % selama 1 menit.
- b. Selanjutnya sediaan direndam dalam etanol 90 % selama 1 menit, etanol 95 % selama 1 menit, etanol 100 % I (kesatu) selama 1 menit, etanol 100 % II (kedua) selama 1 menit, campuran etanol : *xylol* (1:1) selama 1 menit, *xylol* I (kesatu) atau *chloroform* I (kesatu) selama 3 menit, *xylol* II (kedua) atau *chloroform* II (kedua) selama 5 menit, *xylol* III (ketiga) atau *chloroform* III (ketiga) selama 5 menit.

6.6.4 *Mounting*

Angkat sediaan lalu dibersihkan sekelilingnya kemudian ditetesi dengan *entellan*.

CATATAN *mounting* merupakan proses perekatan gelas penutup dengan zat perekat supaya sediaan jaringan tidak rusak.

7 Interpretasi hasil

Pembacaan hasil untuk diagnosa dengan metoda komparasi dibawah mikroskop dengan perbesaran 40 kali - 1000 kali. Preparat menunjukkan positif KHV apabila ditemukan perubahan yang mencirikan sebagai berikut:

- 1 Pada insang :
 - a. Sel-sel *respiratory* pada lamela membesar dan nekrotis dengan inti yang mengalami degenerasi (*marginal chromotosis*) dan terbentuk *intranuclear inclusion body* diikuti dengan bergabungnya lamela karena perbanyakan sel-sel epitel interlamela sesuai Gambar D.1.
 - b. Pada *lamella* yang bersatu dapat diamati terjadinya perbanyakan sel dari sel-sel epitel interlamela (*hypertropy*), nekrotis epitel sel juga terjadi dan banyak limfosit yang menginfiltrasi sesuai Gambar D.2, D.3, D.4, dan D.5.
- 2 Pada jantung, adanya *intranuclear inclusion body* dalam sel-sel *myokardial* yang dikelilingi banyaknya limfosit sesuai Gambar D.6.
- 3 Pada ginjal, sebagian dari sel-sel *hematopoietic* memperlihatkan *intranuclear inclusion body* dan sel epitel *renal tubular* memperlihatkan bentuk yang sama, terbentuknya benang-benang *hyalin* dan *vakuola* sesuai Gambar D. 7 dan D.8.
- 4 Pada otak, ikan yang berenang tidak normal karena KHV terjadi pendarahan disekitar kapilar darah pada *medula oblongata* dan *valvula cerebelli*. Kapilar darah memperlihatkan peradangan dengan adanya *infiltrasi* sel-sel *inflammatory* sesuai Gambar D.9.

8 Jaminan mutu

- a. Perendaman contoh pada larutan *Bouins* dilakukan selama 24 jam untuk selanjutnya dipindahkan ke larutan alkohol 70 %.
- b. Perendaman contoh juga dapat dilakukan pada larutan formalin *buffer* 10 % hingga saat diembedding.

Lampiran A (normatif)

Komposisi bahan kimia dan cara pembuatan larutan yang dibutuhkan dalam pemeriksaan KHV dengan metoda histopatologi

A.1 Pembuatan larutan eosin

Cara membuat:

a. Pembuatan larutan stok eosin

– eosin y	1 g
– akuades	100 ml

b. Pembuatan larutan eosin yang siap digunakan

– larutan stok eosin	35 ml
– etanol 80 %	110 ml
– phloksin 1 %	5 ml
– asam asetat glacial	1,5 ml

A.2 Pembuatan larutan hematoxylene

– hematoxylene crystal	2,5 g
– etanol absolut (95 %)	50 ml
– ammonium alum atau potassium alum	50 g
– akuades	500 g
– mercurie oxida	1,5 g
– asam asetat glacial	20 ml

Cara membuat:

- Larutkan *hematoxylene crystal* dalam etanol absolut.
- Larutkan *ammonium alum* atau *potassium alum* dalam akuades.
- Campurkan a dan b, didihkan.
- Tambahkan *mercurie oxida*, dinginkan pada air es.
- Nukleus akan terwarnai dengan baik bila pada larutan ditambahkan *asam asetat glacial*.
- Saring dengan kertas saring.

A.3 Pembuatan larutan buffer netral formalin 10 %

– fomaldehyda 37 %	100 ml
– akuades	900 ml
– natrium dihidrogen difosfat (NaH_2PO_4)	4 g
– natrium fosfat	6 g

Cara membuat:

Campurkan semua bahan di atas.

A.4 Pembuatan larutan *Bouin's*

- | | |
|--|----------------|
| – asam pikrat jenuh, yang dilarutkan dengan akuades sampai jenuh | 750 ml |
| – formalin 37 % - 40 % | 250 ml |
| – <i>asam asetat glasial</i> | 50 ml - 100 ml |

Cara membuat:

Buat stok larutan asam pikrat jenuh dengan akuades, kemudian ambil 750 ml dan tambahkan formalin 37 % - 40 % sebanyak 250 ml. Terakhir tambahkan *asam asetat glasial* 50 ml.

A.5 Pembuatan etanol 70%

- | | |
|-------------------------|--------|
| – etanol absolute (p.a) | 700 ml |
| – akuades | 300 ml |

Cara membuat:

Campurkan etanol absolute (p.a) ke dalam akuades dengan perbandingan 70 : 30

A.6 Pembuatan etanol 90%

- | | |
|-------------------------|--------|
| – etanol absolute (p.a) | 900 ml |
| – akuades | 100 ml |

Cara membuat:

Campurkan etanol absolute (p.a) ke dalam akuades dengan perbandingan 90 : 10

A.7 Pembuatan etanol 95 %

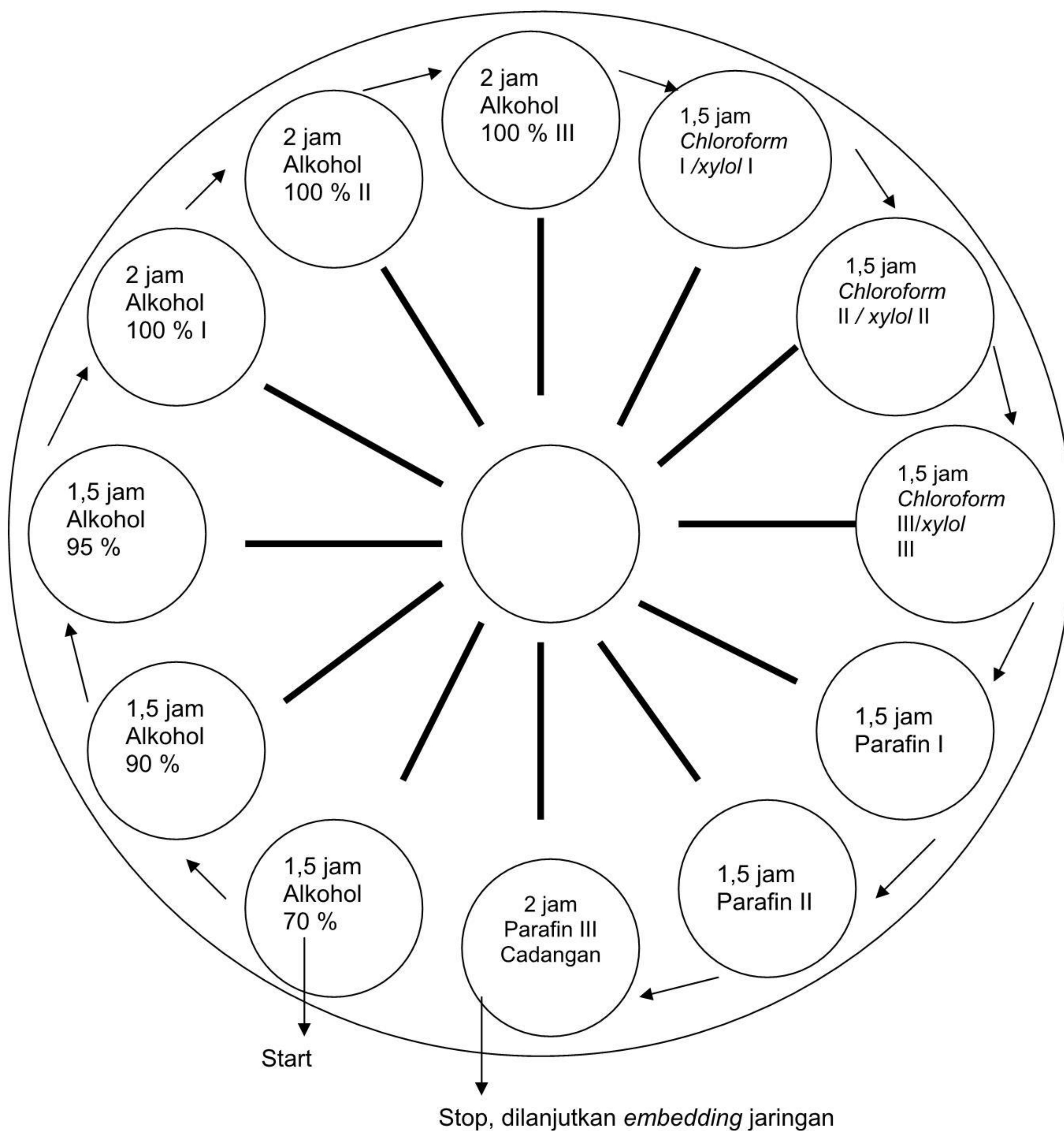
- | | |
|-------------------------|--------|
| – etanol absolute (p.a) | 950 ml |
| – akuades | 50 ml |

Cara membuat:

Campurkan etanol absolute (p.a) ke dalam akuades dengan perbandingan 95 : 5

Lampiran B
(normatif)

Diagram alur dan bahan kimia yang diperlukan dalam proses jaringan pada automatic tissue processor



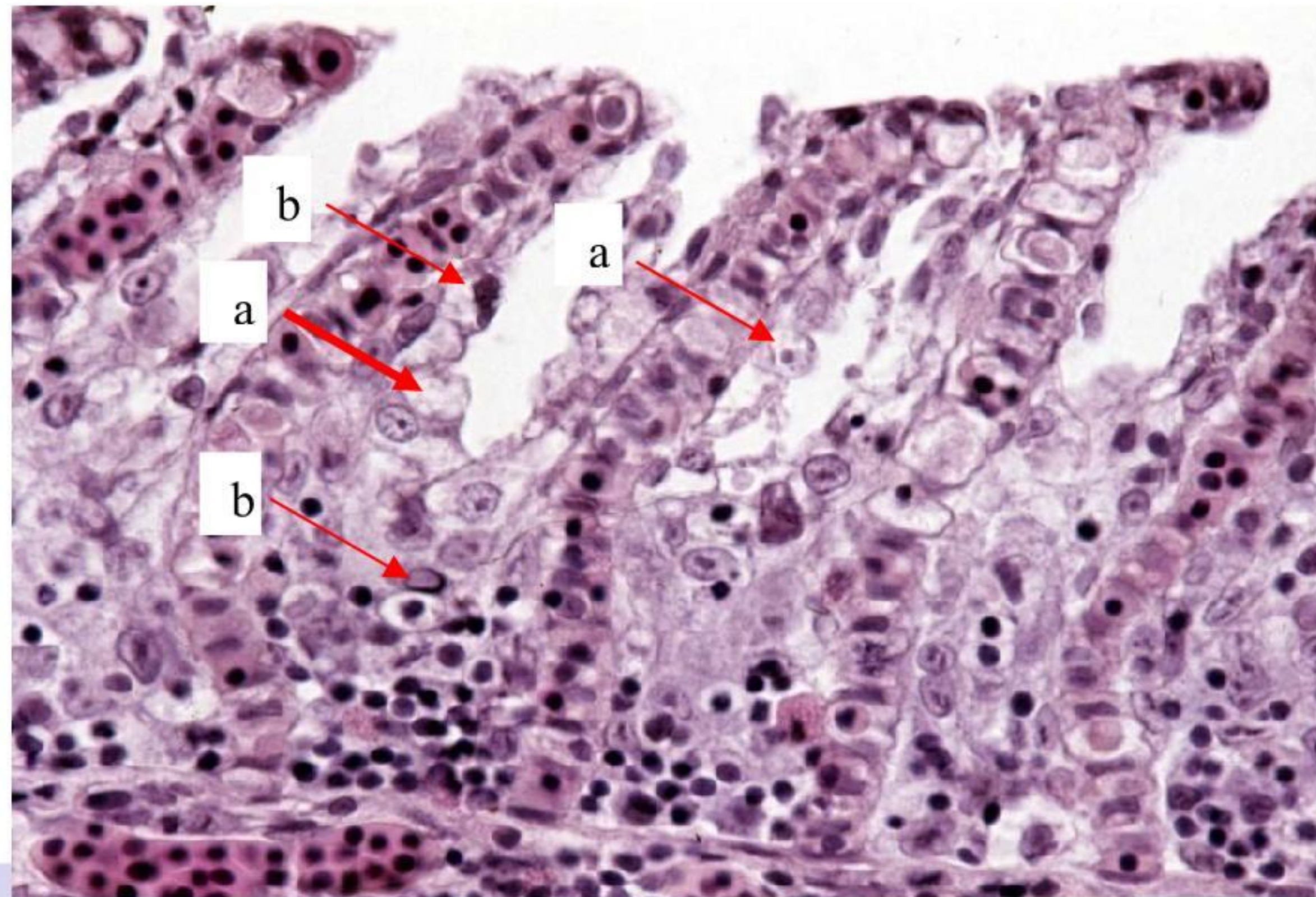
Gambar B.1 - Diagram alur dan bahan untuk proses jaringan pada *automatic tissue processor*. Proses dehidrasi (dari etanol 70% s.d etanol 100%), proses *clearing* (dari *xylol I* / *chloroform I* s.d *xylol III* / *chloroform III*), dan proses *infiltrasi* parafin (dari parafin I s.d parafin terakhir).

Lampiran C
(normatif)
Prosedur pewarnaan hematoxylene - eosin

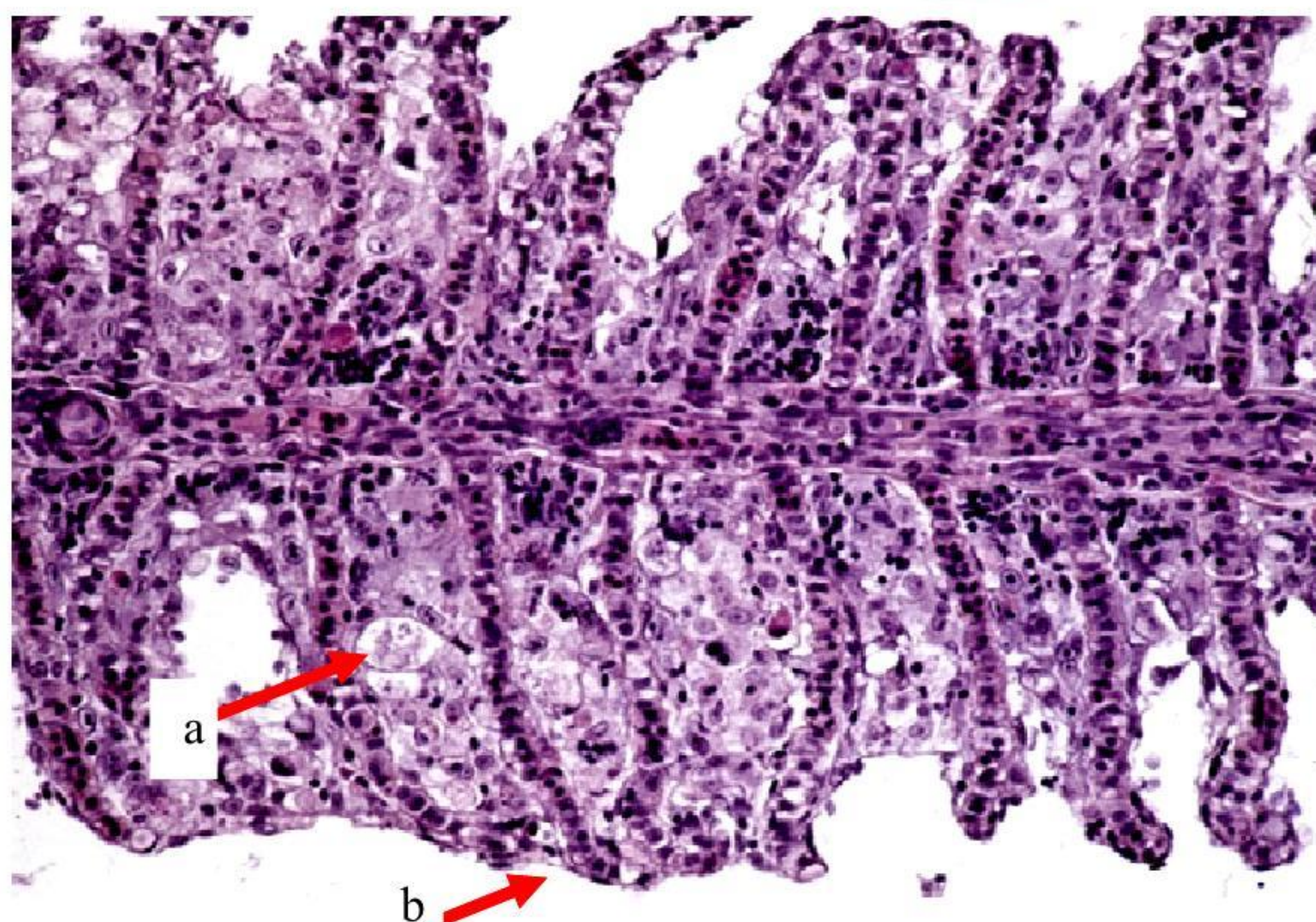
- *xylo/ I* = 15 menit
- *xylo/ II* = 15 menit
- *xylo/ III* = 10 menit
- alkohol 100 % I = 10 menit
- alkohol 100 % II = 10 menit
- alkohol 95 % = 5 menit
- alkohol 90 % = 5 menit
- alkohol 70 % = 3 menit
- air mengalir (*tap water*) = 2 menit
- akuades (DW) = 3 menit
- *hematoxylene (delafield)* = 50 detik - 1 menit, (*mayer*) = 1,5 menit
- air mengalir (*tap water*) = 8 menit
- akuades (DW) = 3 menit
- *eosin* = 30 menit
- Etanol 70 % = 1 menit
- Etanol 90 % = 1 menit
- Etanol 95 % = 1 menit
- Etanol 100 % I = 1 menit
- Etanol 100 % II = 1 menit
- Etanol *xylene* 1 menit (alkohol : *xylene*=1:1)
- *xylo/ I* = 3 menit
- *xylo/ II* = 5 menit
- *xylo/ III* = 5 menit
- *cover*.

CATATAN Alkohol 70 % dan 90 % setelah *eosin* jangan diganti atau warna tetap merah.

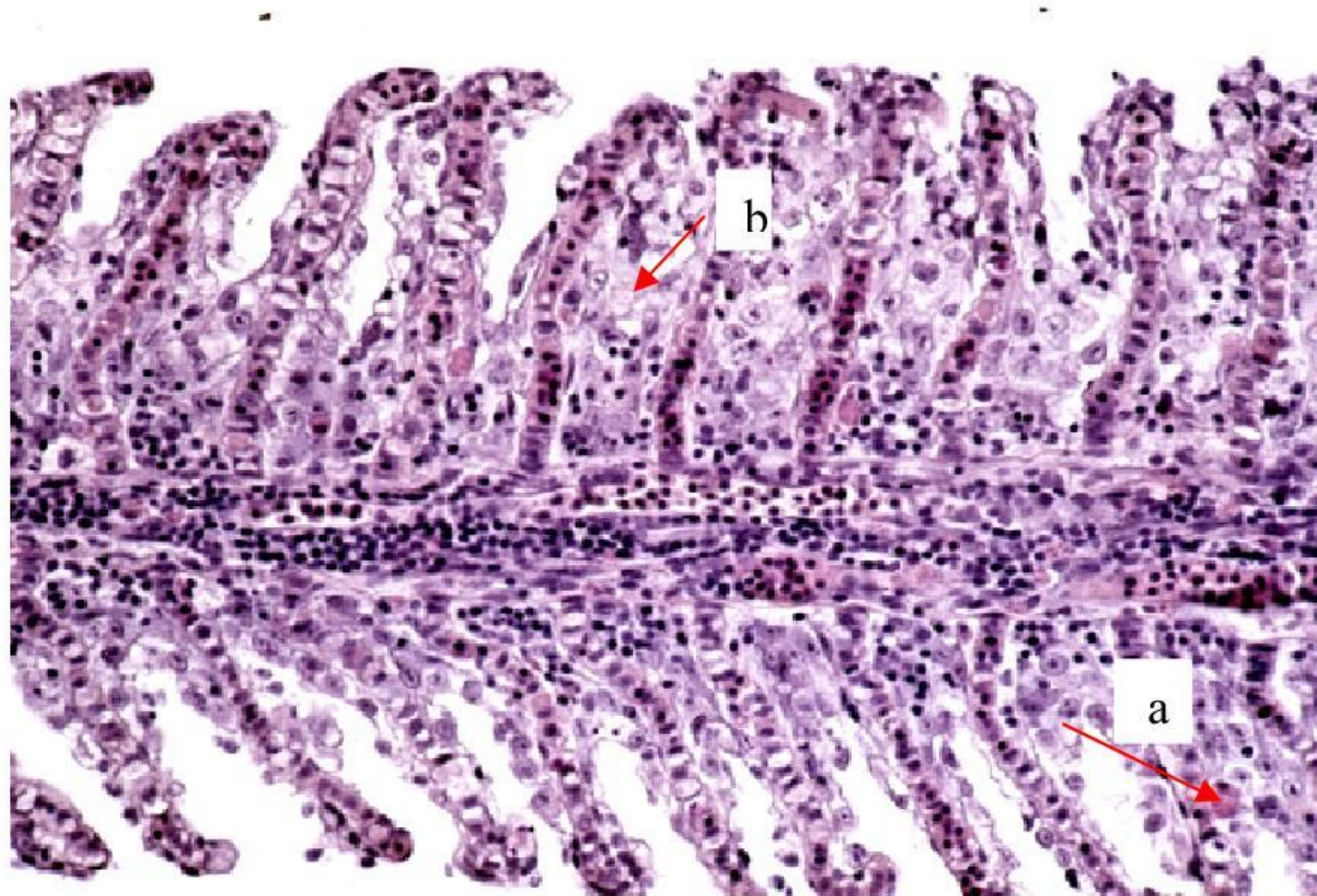
Lampiran D
(informatif)
Contoh gambaran hispatologi ikan mas



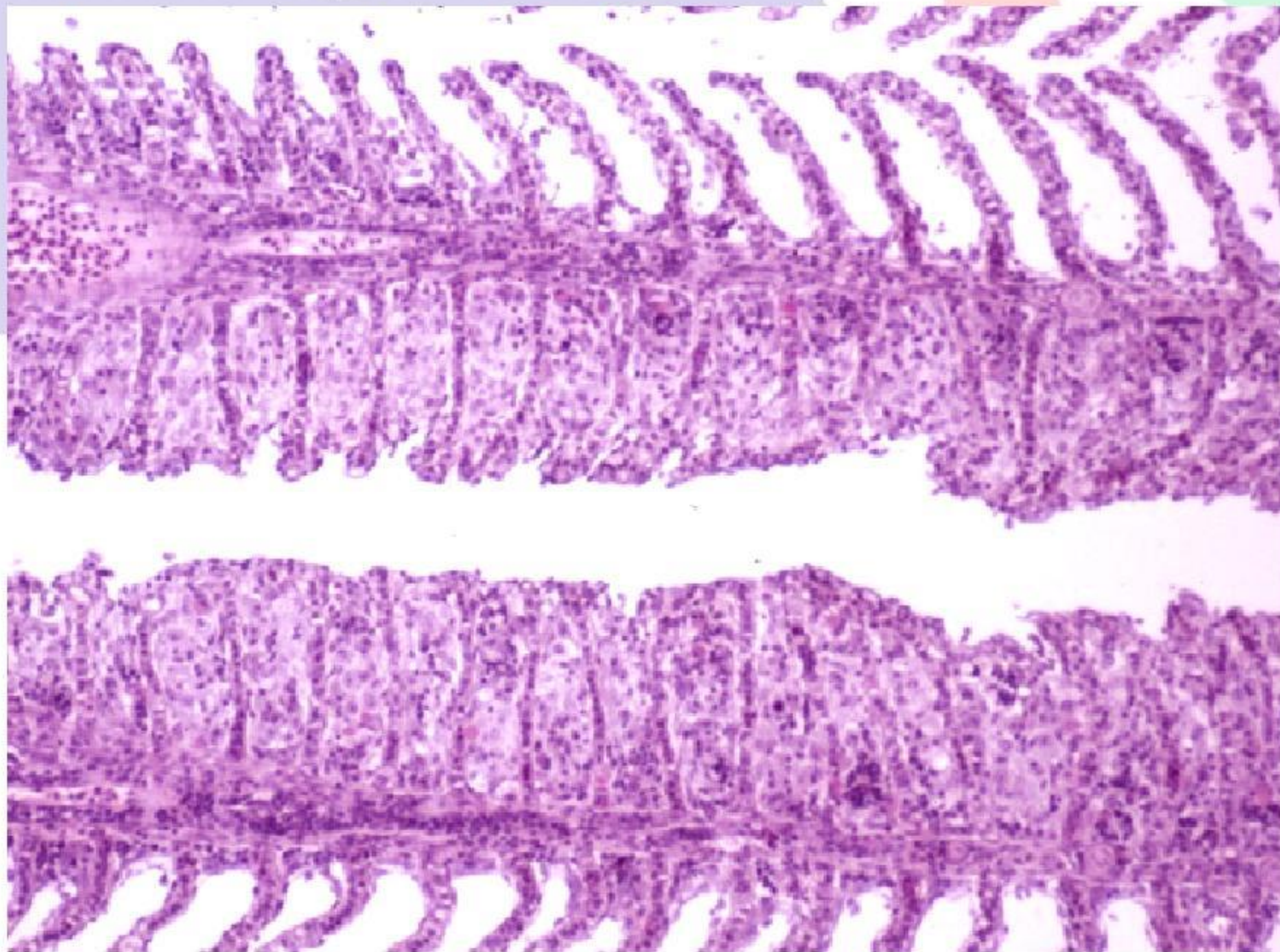
Gambar D.1 - Sebuah filamen insang ikan terinfeksi KHV. Semua sel epitel *respiratory* membesar atau membentuk vakuola. Sel-sel epitel yang terinfeksi KHV memiliki sitoplasma yang pucat (a). Sel dengan *intranuclear inclusion body* (b) tampak pada interlamela epitel. H & E.



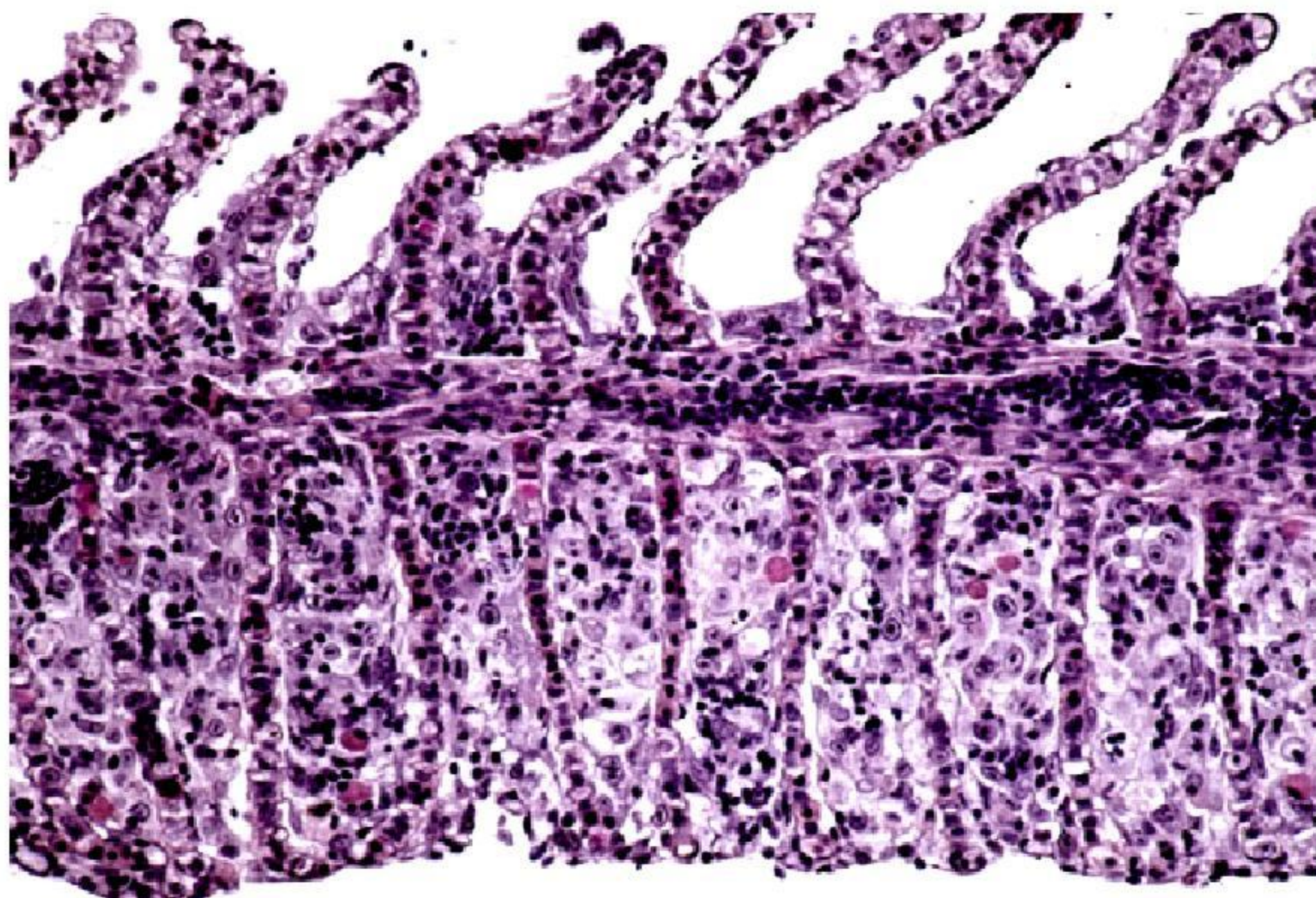
Gambar D.2 - Sebuah filamen insang ikan terinfeksi KHV. Sel-sel epitel *respiratory* pada lamella dan sel-sel interlamela terinfeksi KHV dan membesar. Sel-sel yang membesar ini, memiliki sitoplasma pucat dan terdapat degenerasi inti, mengindikasikan nekrosis (a). Lamela insang juga mengalami penyatuan (b).



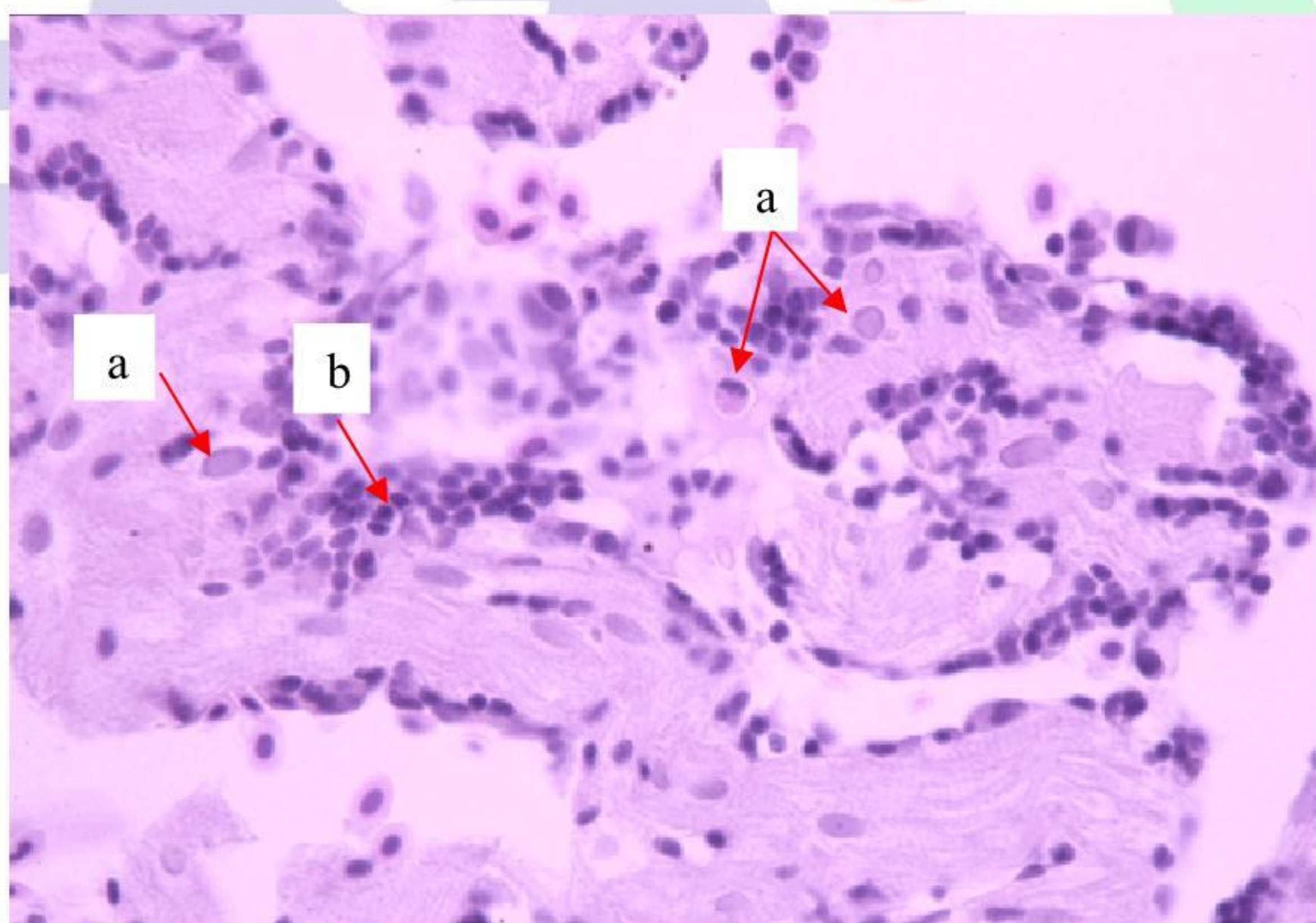
Gambar D.3 - Sebuah filamen insang ikan terinfeksi KHV. Pada filamen insang ini, terlihat banyak limfosit yang menginfiltrasi ke jaringan penghubung (a) dan interlamela insang yang terdiri dari perbanyakan sel dan sel yang nekrosis (b). H & E.



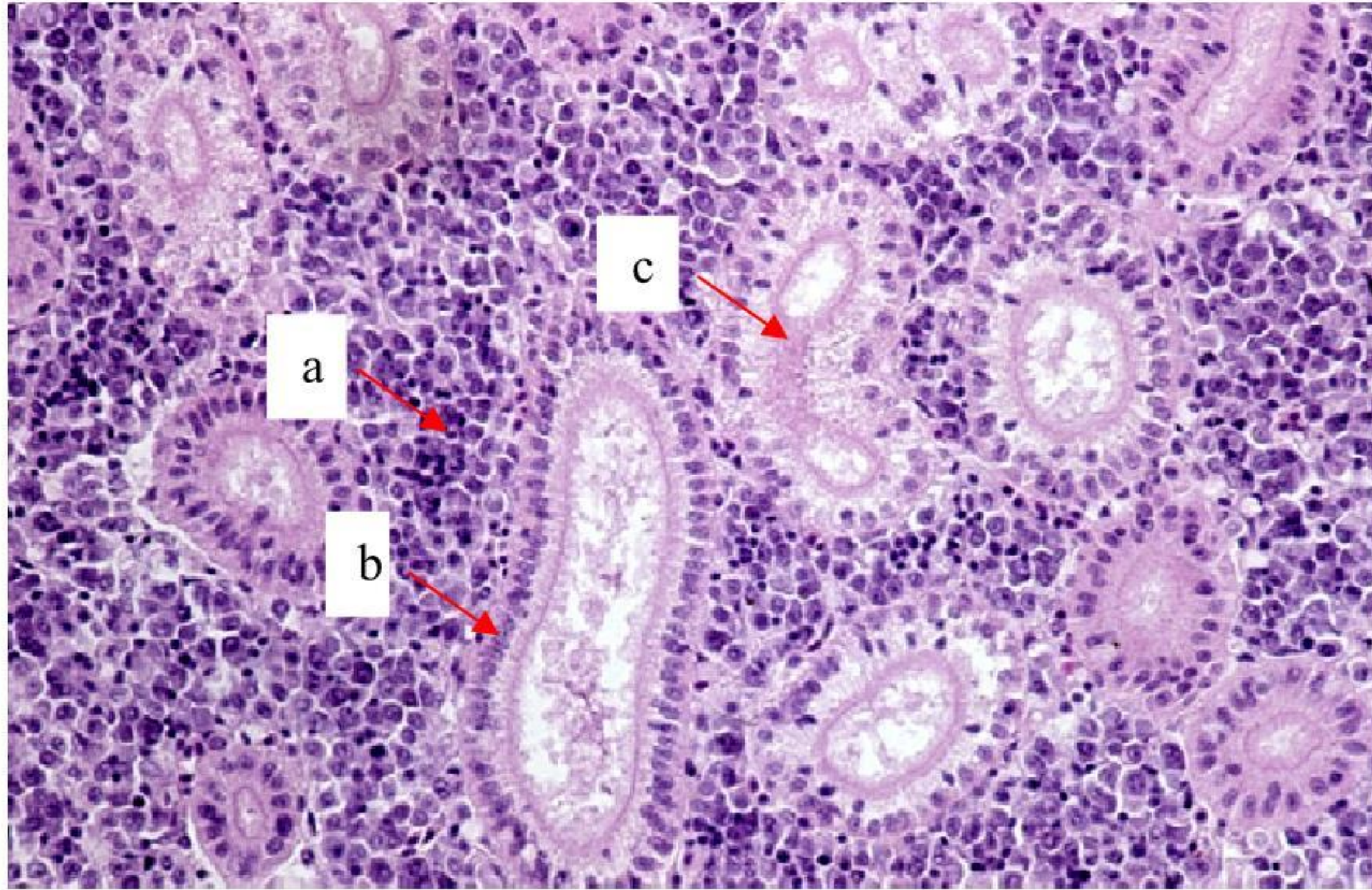
Gambar D.4 - Filamen insang ikan yang terinfeksi. Perbanyakan sel yang terjadi pada sel epitel interlamela yang nekrosis karena infeksi KHV mengakibatkan penyatuan lamela insang. H & E.



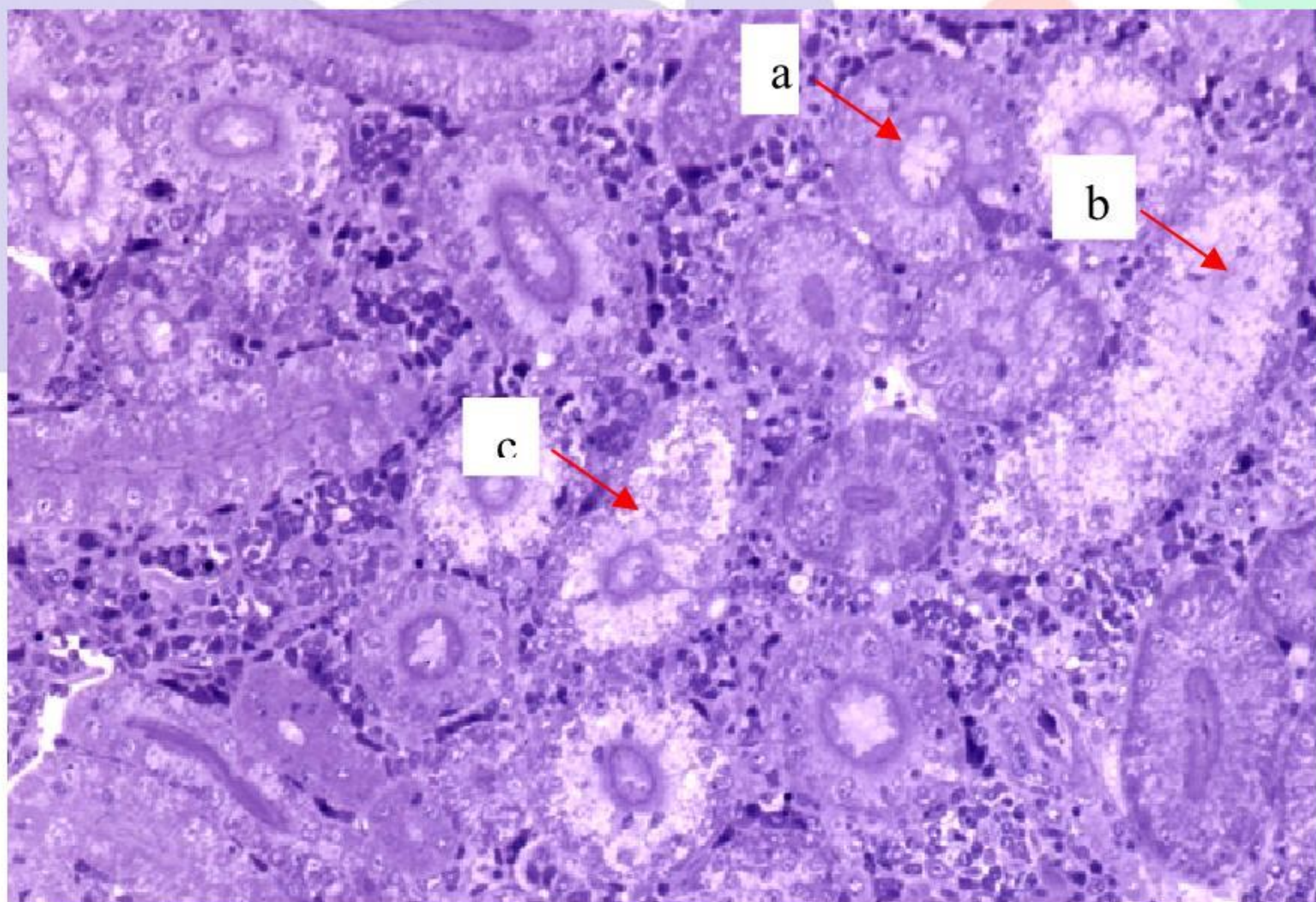
Gambar D.5 - Detail Penggabungan filamen insang. Perbanyakkan sel epitel interlamela yang telah mencapai bagian atas lamella insang. Tampak beberapa sel juga mengalami nekrotik dan banyak *lymphocytes* yang memasuki interlamela epitel. H & E.



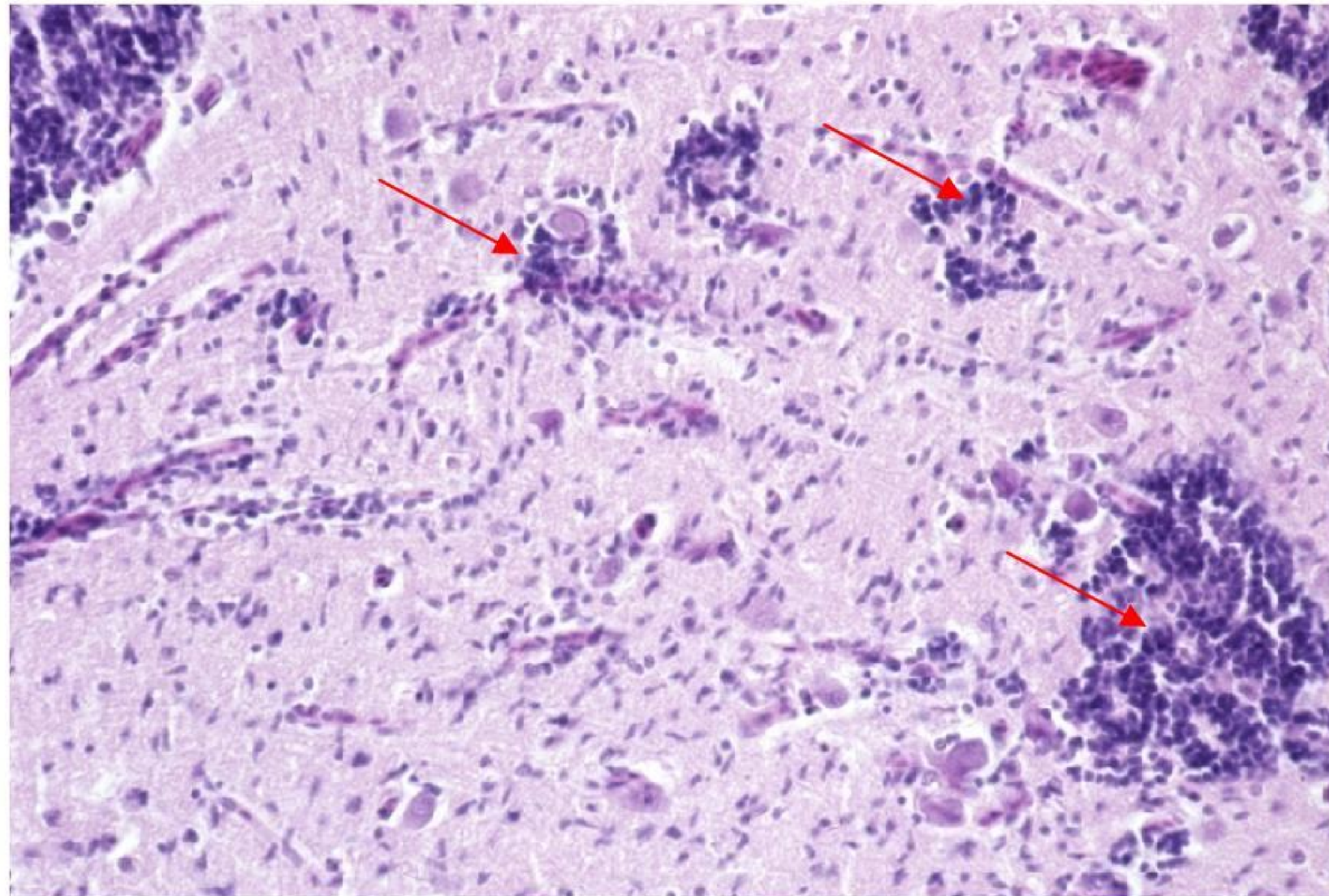
Gambar D.6 - *Myocardial* pada ventrikel jantung ikan terinfeksi KHV. Sel *myocardial* memperlihatkan inklusi intranuklir (a) yang diikuti infiltrasi sel-sel *inflammatory* (b). H & E



Gambar D.7 - Ginjal ikan yang terinfeksi KHV. Pada sel-sel hematopoietik tampak *intranuclear inclusion body* dengan kromatin yang menepi yang menunjukkan gejala terinfeksi KHV (a). Sel-sel epitel *renal tubular* terlihat samar (*cloudy appearance*)(b) dan bintik kecil kemerahan (*hyaline droplet degeneration*) (c). H & E.



Gambar D.8 - Ginjal ikan yang terinfeksi KHV. Sel-sel epitel *renal tubular* terlihat samar (*cloudy appearance*)(a), *hyaline droplet degeneration* (b) dan terjadi *vakuola* (c) Pewarnaan *toluidine blue* .



Gambar D.9 - *Valvula cerebelli* ikan yang terinfeksi KHV yang memperlihatkan gejala berenang tidak normal. Pembuluh kapiler dan pembuluh vena kecil dipenuhi oleh sel darah merah (panah). H & E.



Bibliografi

Armed Forces Institute of Pathology.1957. *Manual of Histologic and Special Staining Technics*. General Pathology Laboratory, Washington, D.C. 205 pp.

Kholidin, E.B. 2007. *Studies on Koi Herpesvirus Diseases Occured in Indonesia*. Master Thesis. Faculty of Bioresources, University of Mie. Mie, Japan, 54 pp.

Lightner, D.V. 1987. *Handbook of pathology*. Department of Veterinary Science. University of Arizona. Tucson, Arizona 85721. USA.

Miyazaki, T. 2007. *Color Atlas of Fish Histopathology*. Vol. II. Shin Suisan Shinbun sha, Ltd., Tokyo.

Panigoro, N. 2007. Teknik Dasar Histologi dan Atlas dasar-dasar histopatologi Ikan. BBAT Jambi dan JICA, Sumatra

Tendenchia-Eleonora, A. *Preparation of Solution, Reagents, Steril Material and Culture Media. Practical Guide in Head Management in Aquaculture*. Aquaculture Departement. Seafdec. Philippines.











BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3,4,7,10
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id